

利用大孔微载体体外制备工程化组织

汤强, 周燕, 陈飞, 谭文松

华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

摘要: 组织工程从诞生至今已有二十年的历史, 微载体在组织工程领域的应用研究近年来才日趋升温。利用大孔微载体 Cytopore 体外构建工程化微构组织, 并基于其聚团特性, 进行灌注再装配大组织的尝试。结果 20 d 内微构组织达最高细胞密度 16.4×10^7 cells/cm³; 32 d 后, 所形成的微构组织整体均质性好、活性高、基质生成丰富; 培养后期微构组织发生明显聚团, 经灌注再装配得到细胞和基质分布均匀的厘米级(12 mm × 6 mm)大组织。说明利用大孔微载体构建工程化组织是一种行之有效、富有潜力的体外组织构建方案, 有望构建尺寸 ≥ 5 mm、细胞和基质分布均匀的大组织。为体外组织构建提供新的思路。

关键词: 大孔微载体, 微构组织, 聚团, 大组织

Preparing Engineered Tissues *in vitro* by Macroporous Microcarriers

Qiang Tang, Yan Zhou, Fei Chen, and Wensong Tan

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Macroporous microcarriers (Cytopore) were used to construct microfabricated tissues. Perfusion approach was used to reassemble macrotissue on the basis of their aggregative property. Microfabricated tissues reached the maximum cell density with 16.4×10^7 cells/cm³ after 20 days. They were uniform with high cell viability and massive matrix as a whole after 32 days. The aggregation of the microfabricated tissues was visible especially in the later period of the culture, and a centimetre-size(12 mm × 6 mm)macrotissue with uniform cell and matrix distribution was obtained through perfusion reassembly. Constructing engineered tissues using macroporous microcarriers was effective and promising.

Keywords: macroporous microcarriers, microfabricated tissue, aggregation, macrotissue

组织工程具有广阔的开发和应用前景^[1], 在过去二十年里取得了长足的发展, 相关研究层出不穷, 相关产品已用于临床研究^[2]甚至商品化^[3]。但是当前组织工程仍面临着巨大挑战, 其中比较突出的问题

Received: April 3, 2007; Accepted: June 4, 2007

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No.20576036) and the Key Program of Science and Technology Commission Foundation of Shanghai City (No. 05DZ19328).

Corresponding author: Yan Zhou, Tel: +86-21-64253394; Fax: +86-21-64252250; E-mail: zhouyan@ecust.edu.cn

国家自然科学基金(No. 20576036)和上海市科委重大科研攻关课题项目(No. 05DZ19328)资助。

有: 传递(包括种子细胞、氧等物质在支架材料的分散)、体外血管化和过程放大等^[4,5]。

为满足替代移植的几何尺寸需要, 传统组织构建支架都直接选用较大体积单位的材料(尺寸 1mm), 随支架厚度的增加, 种子细胞、氧等物质的传递限制逐渐增大。当支架材料的尺寸在 1mm 以上时, 由于传递制约, 细胞在支架上的整体分布趋向非均质化^[6], 材料内部供养不足, 细胞活性下降, 并可能出现坏死区^[7]。体外血管化主要旨在提高物质传递效率, 以维持工程化组织的活性, 目前仍只停留在初步尝试阶段^[5]; 组织工程过程的放大依赖于组织形成效率及过程的稳定性、可操作性等, 这些同样受种子细胞、氧等物质的传递制约, 如何实现少量种子细胞高效扩增并构建满足临床意义的大尺寸组织仍是一大挑战^[8]。

组织微构技术指将种子细胞接种到直径为几百微米的组织工程微型支架材料(微载体)上, 调控体外培养条件, 形成具有与天然组织相似的微构复合物(微构组织)的过程。它兼具微载体用于贴壁依赖性动物细胞悬浮培养的优点^[9]和几何尺寸小($\phi 100\sim 400\ \mu\text{m}$)、可塑性强等特点, 能够有效地缓解传递制约, 且易于过程放大以实现规模化。

微载体在组织工程领域的应用研究近年来日趋升温, 但大多是利用微载体悬浮培养技术进行组织工程种子细胞的扩增^[10,11]和用来充当体内细胞治疗的传输载体^[12], 专门用于组织微构技术进行工程化微构组织体外构建的相关研究鲜有报道^[13]。此外体外基于工程化微构组织单元构筑大组织的研究未见报道。本研究以人成纤维细胞为模式种子细胞, 利用大孔微载体 Cytopore 体外构建工程化微构组织, 对过程中的细胞增殖、代谢特性及工程化微构组织的空间分布、活性、形貌和基质形成情况进行系统考察; 并基于工程化微构组织的聚团特性, 进行灌注再装配大组织的尝试, 以构建厚度 5 mm、细胞和基质分布均匀的大尺寸组织。

1 材料与方 法

1.1 种子细胞制备

人成纤维细胞(Human Fibroblast, HF)的分离参照文献^[14]报道的方法, 从新鲜健康的小儿包皮组织中分离, 获得的 HF 加入含 100 u/mL 庆大霉素、

100 u/mL 青霉素和 10%NBS 的 DMEM 培养基(Gibco), 吹匀并转移至方瓶中, 置于 37°C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 每 3 d 换液 1 次。原代细胞长至融合状态时, 用胰酶消化, 按 1:3 或 1:4 比例进行传代培养。取 6~12 代细胞用于后续实验。

1.2 微构组织制备

采用微载体和转瓶培养系统进行微构组织制备。称取 400 mg Cytopore 微载体(Amersham Biosciences), 在 PBS 中水化、膨胀, 漂洗后转至事先已硅化的 500 mL 转瓶(实验室自制), 121°C 蒸汽灭菌 30min, 弃 PBS, 加 150 mL DMEM 培养基于 37°C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中预孵育过夜。弃 DMEM 孵育液, 加入含 HF 的 10% NBS 的 DMEM 培养液, 使初始细胞接种密度为 2×10^5 cells/mL, 于培养箱内间歇搅拌(off 30 min, on 3 min, 25 r/min)贴附 8 h 后, 取样, 并将转瓶搅拌方式改成连续搅拌(50 r/min)。接种后 0~4 d 不换液, 4~8 d 每 2 d 半量换液, 8 d 后每天半量换液; 每 2 d 取样, 用于细胞数、代谢参数及羟脯氨酸的测定和组织 HE 染色、聚团特性分析。

1.3 大组织制备

应用灌注培养体系(图 1)进行工程化微构组织再装配大组织。将 70 mg 大孔微载体培养 24 d 制备的微构组织转移到灌注培养装置内, 于 37°C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中进行灌注培养, 控制培养液流速为 1 mL/min, 培养液每 3 d 更新 1 次, 持续 8 d 后, 取出形成的大组织进行总体观察和组织学检测。

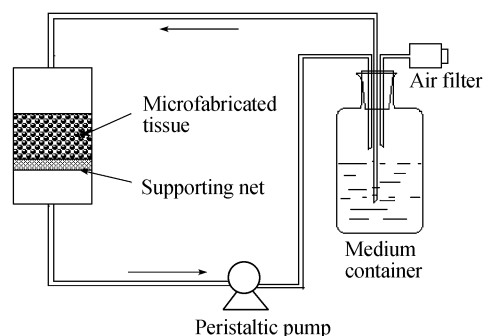


图 1 微构组织灌注再装配

Fig. 1 Perfusion reassembly of microfabricated tissues

1.4 分析检测方法

1.4.1 细胞计数

采用低渗结晶紫染色法: 取 1 mL 样品于 EP 管中, PBS 漂洗, 加入含 0.1 mol/L 柠檬酸的 0.1% 结晶

紫染色液至终体积 1 mL, 37°C 孵育 5 h, 血球计数板计细胞核数量。

1.4.2 代谢参数检测

微构组织制备过程中葡萄糖、乳酸的浓度的测定采用相应的葡萄糖试剂盒(上海申索生物试剂公司)、乳酸试剂盒(南京建成生物工程公司)。

1.4.3 工程化微构组织的聚团特性分析

样品经等渗结晶紫染色后均匀地平铺到 35 mm 培养皿上, 低倍($\times 40$)镜下随机选取 12 个视野, 分别计数每一视野下单个微载体数、含 2~5 个、含 6~15 个及含 16 个微载体的聚团单位的个数, 并计算各自所占的平均百分比。

1.4.4 组织 HE 染色

样品经 PBS 漂洗, 制作冰冻切片(10 μm 厚), 进行 HE 染色, 二甲苯透明, 中性树脂封片后, 显微镜下观察。

1.4.5 扫描电镜观察

取 1 mL 样品, 经 PBS 漂洗, 用含 3% 戊二醛的 PBS 溶液(pH 7.4)4°C 固定过夜后, 再用含 1% OsO₄ 的 PBS 溶液(pH 7.4)固定, 脱水, 行临界点干燥和喷金操作, 在 JSM-6360LV 扫描电镜下观察。

1.4.6 细胞活性分析

钙黄绿素-AM(CAM)和碘化丙啶(PI)是用于细胞活性检测的典型荧光指示性染料。CAM 扩散进入活细胞, 被胞内非特异性酯酶所水解, 产物在波长为 496 nm 的激发光激发下发射波长 516 nm 的明亮的绿色荧光; PI 扩散进入丧失膜完整性的细胞(死细胞), 与胞内 DNA 结合形成复合物, 该复合物在波长为 540 nm 的激发光激发下发射波长 625 nm 的红色荧光。

取适量培养 32 d 的样品, PBS 漂洗, 用含 4 $\mu\text{mol/L}$ 钙黄绿素-AM(calcein-AM, CAM, Invitrogen Molecular Probe)和 5 $\mu\text{mol/L}$ 碘化丙啶(propidium iodide, PI, Sigma-Aldrich)的 DMEM 无血清培养液孵育 45 min, PBS 反复漂洗, 直接在荧光显微镜(Olympus)下观察、记录并拍照。选择蓝光激发镜组, 其激发滤色镜波长为 450~490 nm, 吸收滤色镜波长为 515 nm, 可观察绿色荧光(CAM 的胞内水解产物的激发光波长为 496 nm, 发射光波长为 516 nm); 选择绿光激发镜组, 其激发滤色镜波长为 510~570 nm, 吸收滤色镜波长为 610 nm, 可观察红色荧光(PI 的

胞内 DNA 复合物的激发光波长为 540 nm, 发射光波长为 625 nm); 另将部分双荧光染料处理组样品制作成冰冻切片, 封片后, 再在荧光显微镜下观察; 对照组未用荧光染料进行处理。

1.4.7 胶原基质分泌检测

微构组织中胶原基质含量以羟脯氨酸量表征。羟脯氨酸则通过碱水解法测试试剂盒(南京建成生物工程公司)测定。

2 结果

2.1 微构组织形成过程细胞增殖和代谢特性

图 2、3 分别反映微构组织大量制备过程中 HF 细胞增殖、代谢特性。在转瓶培养体系中, 接种 8 h 后细胞密度为 0.45×10^7 cells/cm³, 贴附率达 85%。对数生长期, 细胞平均比生长速率为 0.48 d^{-1} , 在第 20 d 达到最高细胞密度 16.4×10^7 cells/cm³, 细胞总扩增倍数为 36.6 倍, 单位微载体平均承载细胞数高达 916 cells/bead。整个过程葡萄糖平均比消耗速率为 $2.53 \text{ mmol}/10^9 \text{ cells}\cdot\text{d}$, 乳酸平均比生成速率为 $5.28 \text{ mmol}/10^9 \text{ cells}\cdot\text{d}$ 。结果表明 HF 细胞在 Cytopore 微载体上能有效地增殖; 通过换液保持培养环境相对稳定, 葡萄糖等主要营养物质能够及时得到补充, 乳酸等主要代谢有害物能够及时排除。

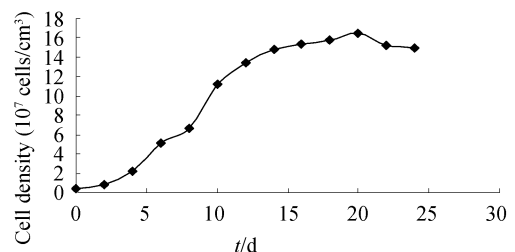


图 2 微构组织形成过程中细胞增殖特性

Fig. 2 The cellular proliferation characterization of microfabricated tissue during formation

2.2 微构组织的 HE 染色

图 4 可以看出 培养 0 d(细胞接种后 8 h)(图 4a), HE 染色几乎观察不到细胞(着蓝色的细胞核), 微载体内部空隙较大; 培养 8 d 后(图 4b), 可以看到每个微载体外表面围着一层着色的细胞核, 微载体之间有初步的架桥现象, 桥上分布有着色的细胞核, 微载体内部支架上也零星分布着细胞; 培养 20 d, 微载体之间发生显著聚团现象, 图 4c 反映的聚团单

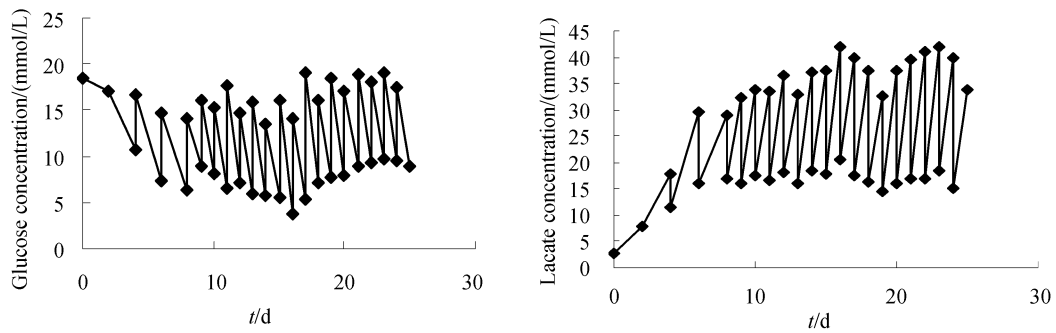


图 3 微构组织形成过程代谢特性

Fig. 3 The metabolic characterization of microfabricated tissue during formation

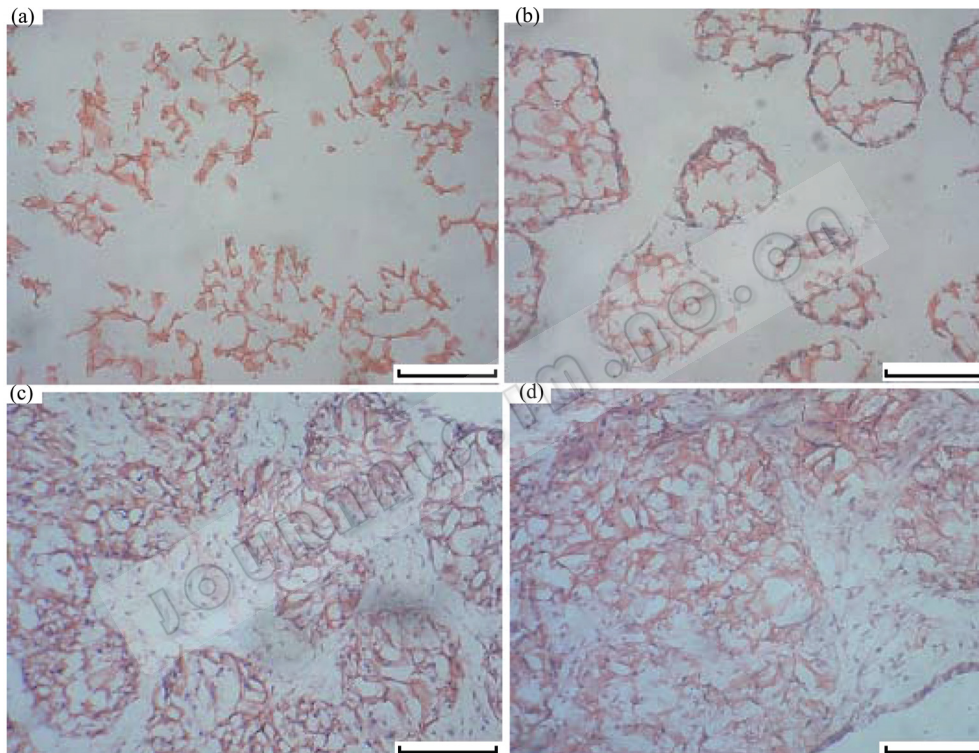


图 4 微构组织形成过程 HE 染色

Fig. 4 The HE staining of microfabricated tissue during formation
Cultured for (a)0 day; (b)8 days; (c)20 days; (d)32 days. 200μm

位至少包含 15 个微载体，连接区域均匀地分布着数量可观的细胞，单个微载体内部空隙显著减少，单位微载体承载细胞数量明显增多，单位聚团内部细胞整体分布均匀，胞外基质沉积比较丰富，切片图中的浅粉红色区域所示；培养 32 d(图 4d)，聚团内部细胞整体分布均匀，边界区域相对密集，相比于培养 20 d，细胞数量变化不明显，但基质沉积显著增多，单位聚团更加密实，内部空隙进一步缩小，更加趋近于天然组织。

2.3 扫描电镜观察

微构组织形成过程的电镜扫描情况如图 5 所

示。接种后 8 h(图 5a)，HF 已经完全黏附并铺展在三维基质上，形态纤长，伸出多处突起，突起边缘又伸出许多枝杈网络状小突起，小突起直接与基质材料相接触。培养 9 d(图 5c1)单个 Cytopore 上承载细胞数比培养 3 d 时(图 5b)明显增多，HF 在 Cytopore 表面铺排更加紧密，Cytopore 孔隙被细胞填补而显著缩小。培养 9 d 已经出现微载体聚团现象(图 5c2, 5c3)，Cytopore 之间架起“细胞桥”，细胞纤长且有相互连接，两端分别锚定在相连的 Cytopore 上，并可见少量沉积的胞外基质。培养 18 d 微载体承载细胞数进一步增多(图 5d)，表面细胞铺排进一步密集，

几乎无孔隙, 基质沉积相比于第 9 d(图 5c2, 5c3)大大丰富, 组织性显著增强。

2.4 细胞活性检测

培养 32 d, 双荧光染料处理组具强烈的绿色荧光(图 6a), 但无明显红色荧光, 而对照组无明显的自发荧光(图 6b), 可见培养 32 d 微构组织的表面呈较好的细胞活性。从双荧光染料处理组的切片样本(图 6c, 6d)进一步可以看出, 微构组织内部细胞分布

均匀, 且未出现明显的坏死性区域, 大部分细胞呈绿色荧光, 少量被染成红色荧光的死细胞零散地分布在视野内, 说明培养 32 d 微构组织内部细胞活性维持较好。

2.5 胶原基质分泌

图 7 反映微构组织形成过程中胶原基质分泌情况。羟脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp)是胶原的特异性氨基酸, 含量比较稳定, 测定胶原水解后羟脯氨酸

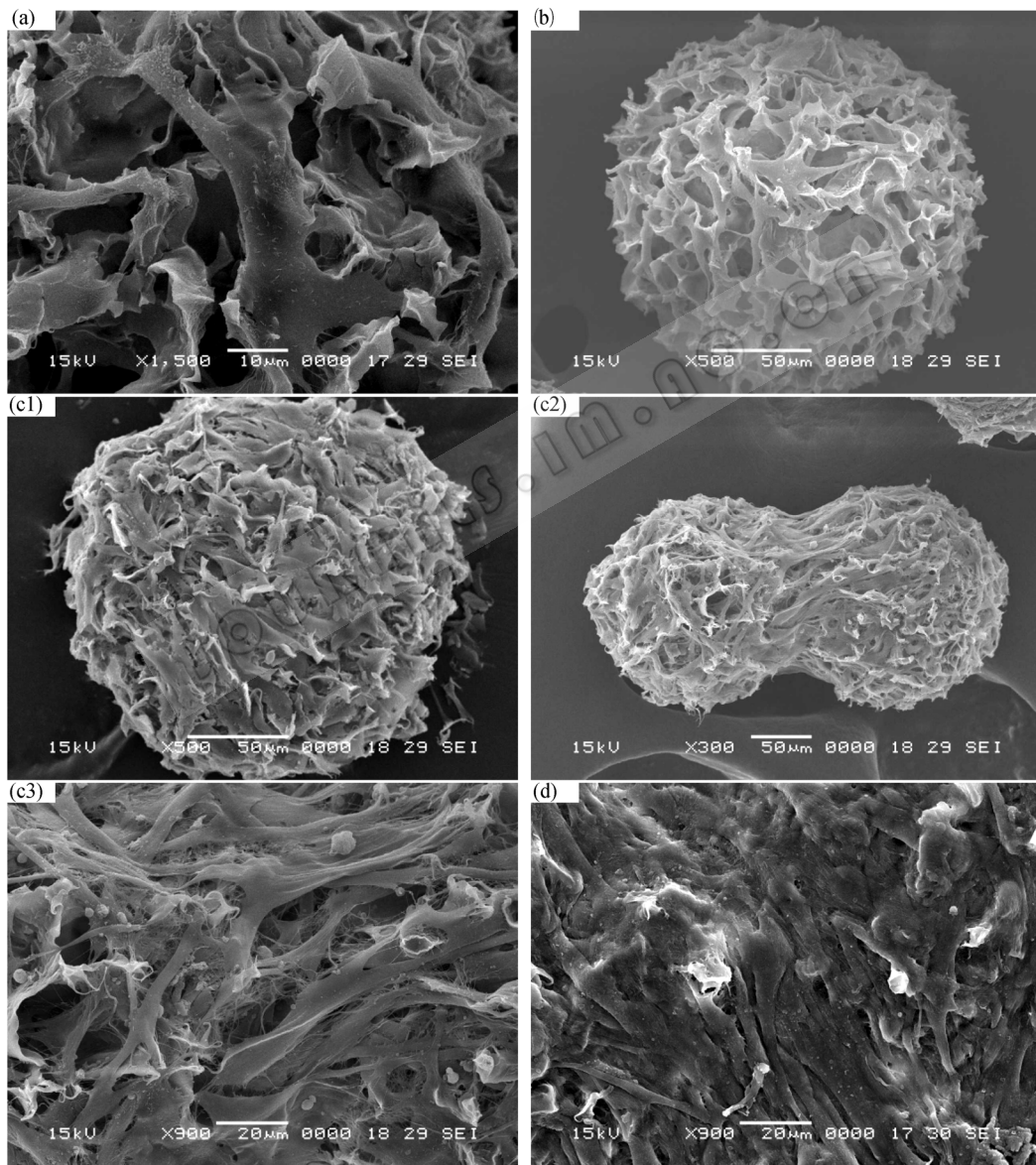


图 5 微构组织形成过程扫描电镜观察

Fig. 5 The SEM observations of microfabricated tissue during formation

(a) Single microcarrier eight hours after inoculation, $\times 1500$; (b) Single microcarrier after three days' culture, $\times 500$; (c1) Single microcarrier after nine days' culture, $\times 500$; (c2) Aggregation of two microcarriers after nine days' culture, $\times 300$; (c3) Aggregation of two microcarriers after nine days' culture, $\times 900$; (d) Aggregation of many microcarriers after eighteen days' culture, $\times 900$

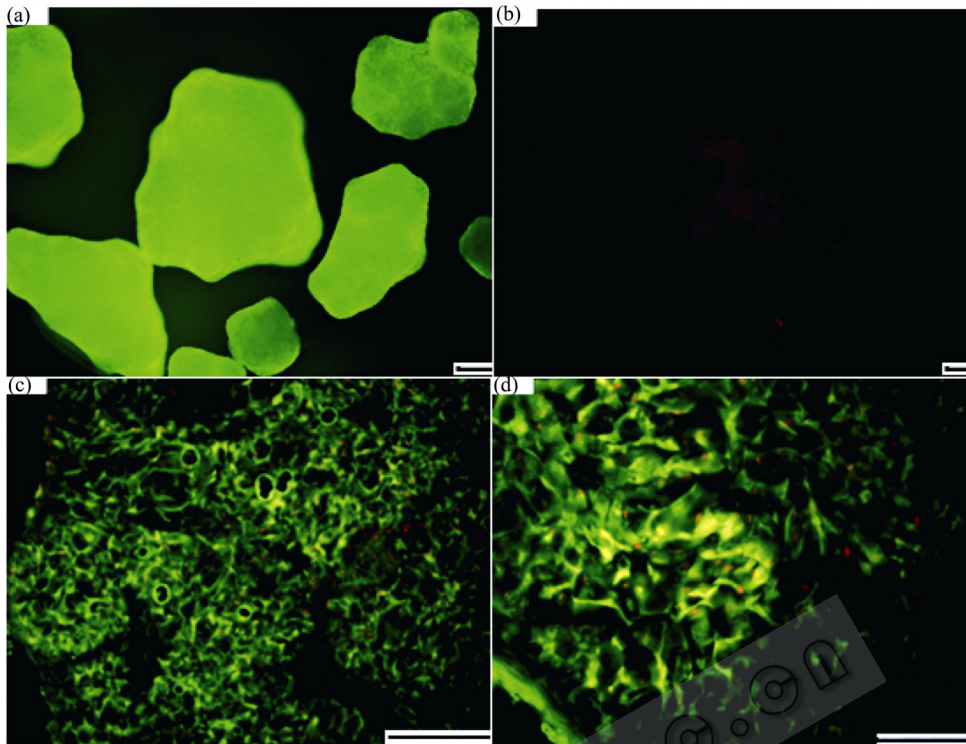


图 6 微构组织活性检测

Fig. 6 The viability estimation of microfabricated tissue after thirty-two days' culture

(a) CAM-PI fluorescent dyes treated groups, 200µm; (b) Control, CAM-PI fluorescent dyes untreated groups, 200µm; (c) Sliced sample, CAM-PI fluorescent dyes treated groups, 200µm; (d) Sliced sample, CAM-PI fluorescent dyes treated groups, 50µm

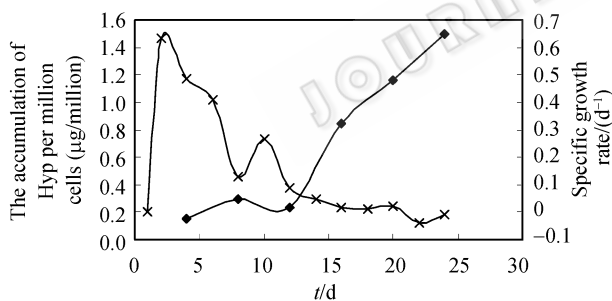


图 7 微构组织胶原分泌

Fig. 7 The collagen matrix secretion of microfabricated tissue

—●— Hyp accumulation per million cells
—×— specific growth rate

的含量是定量组织中胶原含量的常用方法。随培养时间延长，前 12 d 单位细胞胶原沉积量随时间变化不明显，从第 12 d 开始单位细胞胶原沉积量迅速增加，并保持较高的增加速度。结合细胞比生长速率曲线可以看出，当细胞处于快速增殖阶段时，合成胶原的量较少，随着比生长速率下降，细胞生长逐步进入平衡期，开始大量合成胶原，单位细胞胶原沉积量迅速增加。由此可见，微构组织形成过程中

胶原基质沉积随时间是动态变化的，且主要集中在平衡期前后；微构组织形成过程主要包含两个阶段：第一阶段是细胞增殖阶段，为组织功能表达奠定细胞量基础；第二阶段为胶原等胞外基质的分泌沉积阶段，即组织功能的表达和维持阶段。

2.6 微构组织的聚团特性和大组织的制备

微构组织形成过程的聚团特性见图 8。微载体

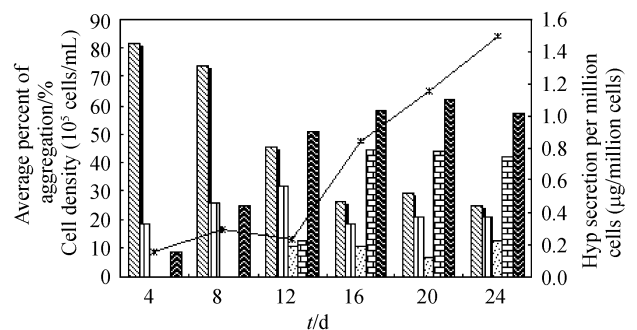


图 8 微构组织形成过程的聚团特性

Fig. 8 The aggregation characterization of microfabricated tissue during formation

▨ single microbeads ▨ 2-5 microbeads/aggre
▨ 6-15 microbeads/aggre ▨ 16microbeads/aggre
▨ cell density —*— Hyp accumulation

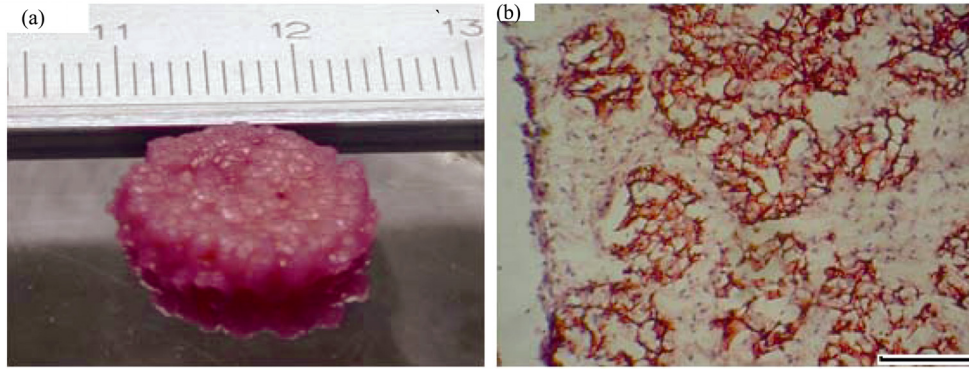


图9 微构组织再装配形成的大组织

Fig. 9 The macro-tissue reassembled from microfabricated tissues

(a) General appearance of macro-tissue; (b) HE staining of macro-tissue. ————— 200μm

的聚团大小随时间发生动态变化,在 8~12 d 和 12~16 d 两个时间段变化尤为显著。在 8~12 d, 单个微球所占比例明显减少,从 74.2%降到 45.2%,大尺度的聚团(包含 6~15 个微球及 16 个微球的聚团)数迅速增加;在 12~16 d, 单个微球所占比例进一步减少,大尺度聚团的比例继续增加,特别是 16 个微球的聚团所占比例上升到 44.3%。16 d 后各聚团单位数所占比例无明显差异,聚团趋于稳定。进一步将微载体聚团变化与细胞增殖和胶原基质沉积相关联,可以发现,培养至 12~16 d 时细胞生长正逐步向平衡期推进,胶原基质沉积开始迅速上升,微构组织聚团变化发生明显突变。这一结果提示,微构组织聚团与细胞密度和胞外基质沉积存在某种依存关系,有待于进一步的研究来阐明。

通过灌注,微构组织可以再装配形成大组织(图 9)。灌注再装配形成的大组织几何形状规则,呈圆柱体形(图 9a),尺寸达厘米级(底面直径×高:12 mm×6 mm)。HE 染色进一步可以看出(图 9b),大组织内部细胞密度高且均匀分布,基质分泌非常丰富,整体组织性强。

3 讨论

大孔 Cytopore 微载体是大孔微载体系列的典型代表之一,较多地用于转化细胞系如 CHO、Vero 细胞等生产高附加值的生物制品的相关研究和开发;由于其组成成分是纤维素,生物相容性较好,在体内能够被缓慢降解^[15],因此也应用于组织工程领域,如充当肝细胞的固定化载体制备生物人工肝^[16]、用

于体外构建类唾液腺组织的相关研究^[17]。本研究中 HF 在 Cytopore 上所达到的最高密度为 916 cells/bead,这与 Yokomizo 等人^[18]培养的 Vero 细胞所达到的最高密度 1235 cells/bead 相近。传统组织构建是直接种子细胞接入平均尺寸 1 mm 的三维支架中进行体外培养。Freed 等人^[19]考察了不同材料厚度对 Petri 皿培养软骨组织的影响,结果表明当支架厚度为 0.088 cm 时,培养 23 d 细胞密度达 14×10^7 cells/cm³,当支架厚度增加到 0.384 cm 时,细胞密度降到 3.5×10^7 cells/cm³,说明随支架厚度的增加,构建的工程化组织的细胞密度不断下降,这是传统组织构建方法难以克服的问题。基于大孔微载体构建工程化组织是一种新型组织构建方案,兼具微载体悬浮培养技术的优点和大孔微载体 Cytopore 几何尺寸小($\phi 200 \sim 280 \mu\text{m}$)、比表面积大、生物相容性好、可塑性强等特点,有效地缓解了传递的尺寸制约,提高了营养物质的利用率,培养 20 d 获得最高细胞密度 16.4×10^7 cells/cm³(Cytopore 平均直径 220 μm),明显高于 Freed 等人采用传统组织构建所达到的最高密度,且微构组织在培养悬液中均匀分布,细胞密度不受支架厚度限制。

在微构组织大量制备过程中,虽然通过换液,使培养环境中葡萄糖基底浓度维持在 7 mmol/L 左右,但乳酸浓度仍较高,乳酸相对于葡萄糖的平均得率系数为 2.08 mmol/mmol,这可能与转瓶培养体系供氧不足有关^[20]。通过采用生物反应器,改善供氧,优化参数,有望控制乳酸生成水平,进一步提高组织形成效率。HE 染色和扫描电镜观察说明 HF 细胞在

三维大孔 Cytopore 上迅速黏附并完全铺展, 细胞行为随时间发生动态变化, 最终形成空间分布均匀, 基质分泌丰富, 均质性好的组织。细胞活性是衡量组织构建的重要指标, 钙黄绿素-AM 和碘化丙啶染色显示, 培养 32 d, 微构组织仍保持较高的活性, 未出现明显的坏死区。羟脯氨酸测定曲线和细胞比生长速率曲线可以推测胶原基质的分泌和细胞密度、比生长速率存在某种关联, 高细胞密度低比生长速率有利于胶原基质分泌, 平衡期的细胞仍保持较高的胶原分泌能力, 说明此阶段微构组织正不断趋于成熟。

过程中微构组织的聚团现象明显, HE 染色、扫描电镜观察及双荧光染色均可看出。进一步研究表明微构组织的聚团随时间呈动态变化, 8~16 d 是变化显著期, 之前无明显变化, 之后聚团趋于稳定; 微构组织的聚团与细胞增殖和胶原基质分泌有关。Shikani 等^[21]用 Cellagen 微载体($\phi 100\sim 400\ \mu\text{m}$)培养软骨细胞时, 在培养的 10~14 d 间也出现明显的微载体的聚团, 最后形成致密的软骨样组织。微构组织聚团是一种复杂的生物过程, 其实质是细胞表面的黏附分子促使细胞与细胞、细胞与基质的粘连。影响聚团的因素很多包括接种密度, 细胞种类、年龄, 培养基组分、二价金属螯合剂、剪切力、温度、黏度等^[22]。

基于微构组织的这种聚团特性, 本研究还进行了微构组织灌注再装配大组织的尝试, 最后得到厘米级尺寸的大组织, HE 染色进一步表明此大组织内部密度高且均匀分布, 基质分泌也非常丰富, 近似于天然组织。本研究提出的微构组织与 Kelm 等人报道^[23]的通过悬滴法将悬浮软骨细胞直接聚团形成的微组织(μm^3 尺度)较为相似, Kelm 等人进一步将软骨微组织(不含支架)作为基本构筑单位, 静态再装配得到直径为 3 mm、厚度为 1 mm 的软骨大组织(mm^3 尺度)。与之类似, 微构组织灌注再装配大组织过程是基于微构组织聚团特性的复杂的生物过程, 涉及细胞黏附、细胞迁移、基质重构等最终微构组织相互融合并发育成大组织。

综上所述, 基于微载体的工程化组织构建策略是一种行之有效的体外组织构建思路, 具有广阔的开发和应用前景。制备的微构组织不仅可以直接用于导管注射法进行微构组织移植治疗, 而且可以再

装配成大尺寸工程化组织以用于大体积组织移植。

REFERENCES

- [1] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*, 1993, **260**: 920–926.
- [2] Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: Current state and prospects. *Annual Review of Medicine*, 2001, **52**: 443–451.
- [3] Naughton GK. From lab bench to market critical issues in tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, **961**: 372–385.
- [4] Griffith LG, Naughton G. Tissue engineered-current challenges and expanding opportunities. *Science*, 2002, **295**: 1009–1014.
- [5] Langer R. Editorial: tissue engineering: perspectives, challenges, and future directions. *Tissue Engineering*, 2007, **13**(1): 1–2.
- [6] Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 2004, **22**(2): 80–86.
- [7] Sutherland RM, Sordat B, Bamat J, et al. Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Research*, 1986, **46**: 5320–5329.
- [8] Vacanti CA. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Engineering*, 2006, **12**(5): 1137–1142.
- [9] van Wezel AL. Growth of cell strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. *Nature*, 1967, **216**: 64–65.
- [10] Malda J, Kreijveld E, Temenoff JS, et al. Expansion of human nasal chondrocytes on macroporous microcarrier enhances redifferentiation. *Biomaterials*, 2003, **24**: 5153–5161.
- [11] Melero-Martin JM, Dowling MA, Smith M, et al. Expansion of chondroprogenitor cells on macroporous microcarriers as an alternative to conventional monolayer systems. *Biomaterials*, 2006, **27**: 2970–2979.
- [12] Bayram Y, Deveci M, Imirzalioglu N, et al. The cell based dressing with living allogeneic keratinocytes in the treatment of foot ulcers: a case study. *British Journal of Plastic Surgery*, 2005, **58**: 988–996.
- [13] Qiu QQ, Ducheyne P, Ayyaswamy PS. 3D bone tissue engineered with bioactive microspheres in simulated microgravity. *In vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, 2001, **37**: 157–165.
- [14] Parenteau NL, Bilbo P, Nolte CJ, et al. The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytochology*, 1992, **9**(1-3): 163–171.
- [15] Martson M, Viljanto J, Hurme T, et al. Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An *in vivo* subcutaneous study in the rat. *Biomaterials*, 1999, **20**: 1989–1995.
- [16] Kino Y, Sawa M, Kasai S, et al. Multiporous cellulose

- microcarrier for the development of a hybrid artificial liver using isolated hepatocytes. *Journal of Surgical Research*, 1998, **79**: 71-76.
- [17] Bucheler M, Wirz C, Schutz A, *et al.* Tissue engineering of human salivary gland organoids. *Acta Otolaryngologica*, 2002, **122**: 541-545.
- [18] Yokomizo AY, Antoniazzi MM, Galdino PL, *et al.* Rabies virus production in high vero cell density cultures on macroporous microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, **85**(5): 506-515.
- [19] Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Langer R. Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1993, **51**: 257-264.
- [20] Robert J, Fleischaker JR, Sinskey AJ. Oxygen demand and supply in cell culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1981, **12**: 193-197.
- [21] Shikani AH, Fink DJ, Sohrabi A, *et al.* Propagation of human nasal chondrocytes in microcarrier spinner culture. *American Journal of Rhinology*, 2004, **18**(2): 105-112.
- [22] Vecht-Lifshitz SE, Magdassi S, Braun S. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, **35**: 890-896.
- [23] Kelm JM, Djonov V, Ittner LM, *et al.* Design of custom-shaped vascularized tissues using microtissue spheroids as minimal building units. *Tissue Engineering*, 2006, **12**(8): 2151-2160.

科学出版社科学出版中心生命科学分社 2007 年精品书回顾

发育的原理(原书第三版)

〔英〕L. 沃尔珀特等 编著 丁小燕等 译

978-7-03-019447-3/Q.1896 ¥98.00 2007年8月30日出版

本书是牛津大学出版社出版的 *Principles of Development* 的导读版。涉及的学科是生命科学的核心学科之一，是一本具有国际水平的优秀参考书。本书主编是一名优秀的发育生物学家，英国皇家科学院院士。本书的其他编者都是各自领域的权威学者，至今仍活跃在科研第一线。因此本书学术水平高，具有权威性和前沿性。

本书对于本科生和研究生以及对发育生物学有兴趣的科研人员都有重要的参考价值。

比较基因组学

〔美〕M. 克拉克 主编 邱幼祥 高翔 等译

978-7-03-019430-5/Q.1895 ¥38.00 2007年8月2日出版

本书讲述了各种模式生物基因组在人类基因组研究与人类基因鉴定中发挥的重要作用。介绍了研究模式生物基因组的不同方法，如突变研究，cDNA 表达图的构建，原位杂交和比较基因组(在基因和核苷酸水平)分析。这一切都将有助于我们对于人类基因组的认识。在探索所有生物基因组进化的连续性和变异性、生物之间的亲缘关系、阐明基因结构和演化、调控序列的结构和功能、内含子的进化以及基因功能方面，比较基因组学更有其特殊的价值。

本书适合高等院校遗传学、分子生物学、生物化学等相关专业的学生、教师及科研人员参考。

Brock 微生物生物学(原书第十版, 影印)(生命科学名著)

〔美〕M.T.马迪根等 编著

978-7-03-018857-1/Q.1841 定价: 168.00 2007年5月出版

本书为《Brock 微生物生物学》(原书第十版)的影印版，涵盖了微生物学的许多新进展，展现了一个全新的组织结构和表达方式，同时也保留了以往版本的精华以便灵活适应新世纪的教学手段。本书共六个部分：微生物学原理，进化微生物学和微生物的多样性，代谢多样性和微生物生态学，免疫、病原和寄主的响应，微生物疾病和微生物在工业生产和科学研究中的应用，其知识全面、内容丰富。

本书适用于高等院校微生物专业的本科生、研究生和科研人员，也可供分子生物学、细胞生物学、生物技术等相关研究领域的教学、科研人员或技术人员参考使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站<http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目